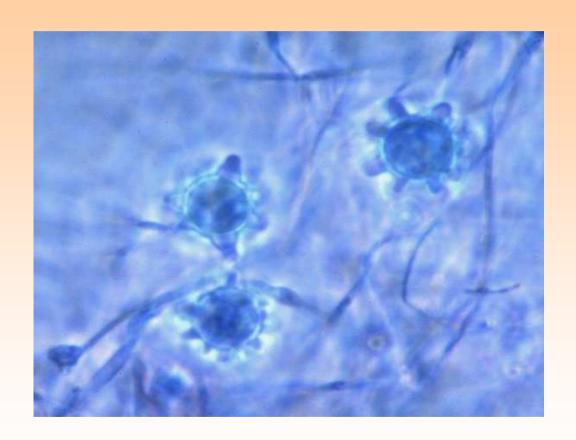
Micosi Endemiche - Dimorfici

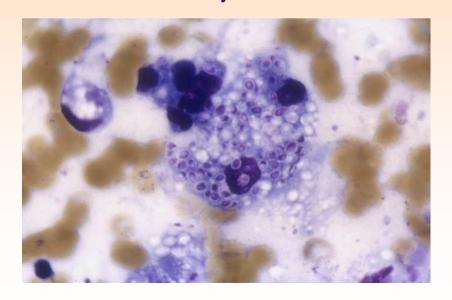
Dr. Lo Cascio Giuliana

“Vere” Micosi sistemiche

- Coccidioidomycosi
- Histoplasmosi
- Blastomycosi
- Paracoccidioidomycosi
- Sporotricosi

- Agenti eziologici: funghi dimorfici termici che esistono in natura, suolo
- Distribuzione geografica è variabile
- Inalazione →inf.polmonare →disseminazione
- Non ci sono evidenze di transmissione fra uomini o animali
- Si ammalano anche individui sani

Histoplasma capsulatum

Istoplasmosi

l'istoplasmosi è un'infezione micotica intracellulare del sistema reticoloendoteliale, causata dall'inalazione di conidi di *Histoplasma*.

Istoplasmosi

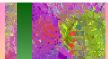
- **EPIDEMIOLOGIA**

- L'*habitat* naturale del micete è rappresentato dal suolo, specialmente quello contaminato con guano di uccelli o di pipistrelli.
- Il genere *Histoplasma* comprende una sola specie, *H. capsulatum*, che riconosce due varianti: *H. capsulatum var.capsulatum* e *H. capsulatum var.duboisii* (endemico in Africa). *H. capsulatum var. capsulatum* presenta una distribuzione ubiquitaria, essendo stato segnalato in tutti continenti. Le aree tropicali sono quelle dove il micete è più diffuso, risultando endemico in Nord-America e America Latina. Altre zone endemiche comprendono Africa, Australia, Malesia e India.
- Tra i miceti dimorfi, è **l'unico presente in Italia**, anche se con diffusione molto limitata (Appennino Tosco-Emiliano).
- *H. capsulatum* var.*duboisii* è invece circoscritto a Paesi africani, dove colpisce primati e uomini.

Istoplasmosi

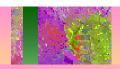
Patogenesi:

- Nella maggior parte dei casi, l'istoplasmosi risulta inapparente, subclinica o benigna, con una sintomatologia modesta. Nella forme benigne, può svilupparsi a livello polmonare un quadro anatomo-patologico simile a quello tubercolare con formazione di granulomi. Gli esiti delle forme acute asintomatiche sono calcificazioni che mimano quelle tubercolari. Sempre a livello polmonare si riconoscono forme acute fulminanti, cavitarie o simil-tumorali.
- Nel 5-7% dei casi si manifesta una malattia cronica polmonare. La malattia cronica polmonare può disseminare con invasione dell'intero sistema reticolo-endoteliale.
- Oltre alle forme polmonari sono da segnalare forme cutanee e, in soggetti immunodepressi, soprattutto se HIV positivi, forme sistemiche e disseminate. In pazienti leucemici si presenta con febbre, epato-splenomegalia, e infarcimento dei tessuti con forme lievitiformi.

CATEGORIES	NOTES
Asymptomatic	1.Occurs in 50-90% of infected individuals
Acute & symptomatic	
1.- Self-limited (Flu-like syndrome)	1.It usually goes unrecognized
2.- Acute Pulmonary	1.Diffuse or localized pneumonitis. 2."Buckshot" appearance on chest radiograph with subsequent calcification in cases of heavy exposure. 3.It may be severe enough to require ventilatory support
3.- Acute Pericarditis	1.Frequently associated with intrathoracic adenopathy 2.Pericardial fluid is usually sterile
4.- Rheumatologic manifestations	1.Arthralgias, arthritis, erythema nodosum, and/or erythema multiforme
Chronic Pulmonary	1.Radiologic presentations include a Ghon complex suggestive of tuberculosis, histoplasmoma, and cavitary disease
Disseminated	1.See Disseminated Histoplasmosis table (below)
Fibrosing Mediastinitis	1.Rare form that produces an intense deposition of fibrotic tissue in the mediastinum encroaching vital structures such as the superior vena cava, esophagus and trachea.

Forma disseminata: presentazione clinica

ORGAN INVOLVED	CLINICAL MANIFESTATION
Lymph nodes	1.Lymphadenitis
Bone Marrow	1.Anemia 2.Leukopenia 3.Thrombocytopenia
Heart	1.Endocarditis
Adrenal glands	1.Enlargement without symptoms 2.Addison's disease
CNS	1.Chronic Meningitis 2.Cerebritis 3.Mass
GI tract	1.Oral ulcers 2.Small bowel micro and macro ulcers
Eyes	1.Uveitis 2.Choroiditis
Skin	1.Papular to nodular rash
Genitourinary tract	1.Hydronephrosis 2.Bladder ulcers 3.Penile ulcers 4.Prostatitis

Istoplasmosi

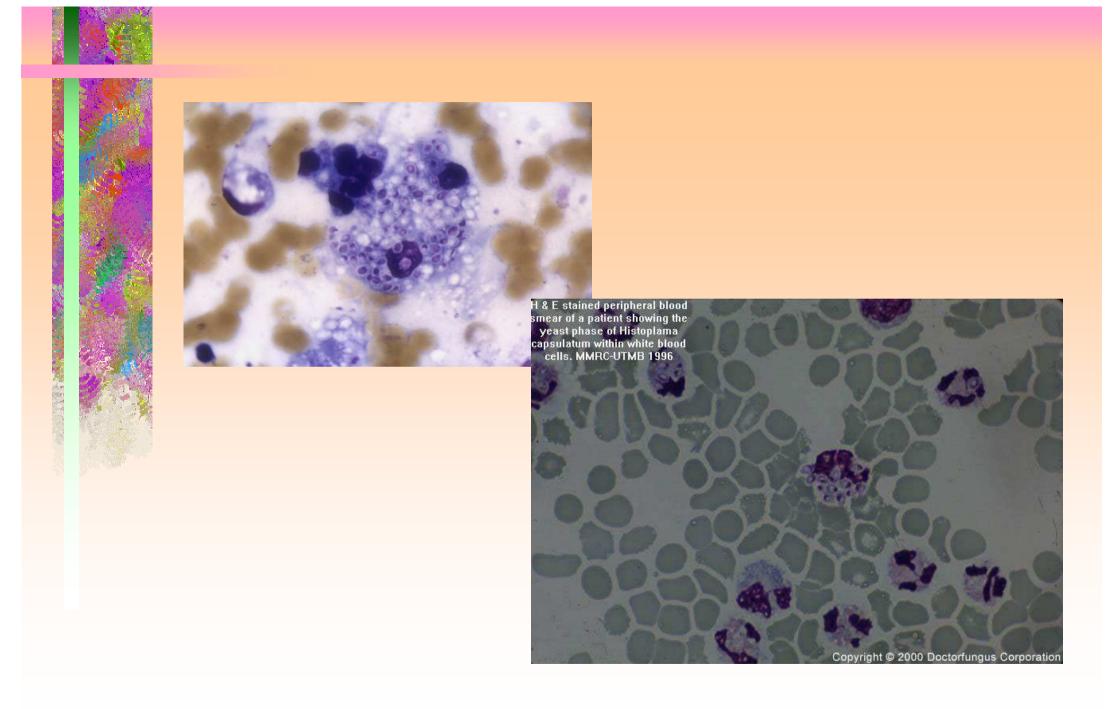
- Patogenicità
- E' stata dimostrata la capacità del fungo di legarsi, tramite il recettore CD18, a monociti di derivazione macrofagica, macrofagi alveolari e polinucleati. La virulenza sarebbe legata alla proprietà di modulare il pH fagolisosomale, con aumento di ferro intracellulare essenziale per la sopravvivenza del micete.

Terapia

CATEGORIES	ANTIFUNGAL TREATMENT	REGIMEN
Asymptomatic	Not indicated	
Acute & symptomatic		
1.- Self-limited (Flu-like syndrome)	Not indicated	
2.- Acute Pulmonary	Treatment indicated ONLY IF presents with hypoxemia or lasts for >1 month	Amphotericin B +/- corticosteroids[1], follow by Itraconazole for a total of 6-12 weeks of therapy
3.- Acute Pericarditis	Not indicated	Nonsteroidal anti-inflammatory agents for 2-12 weeks. Some may want to use corticosteroids for severe cases, in which case antifungal therapy is recommended
4.- Rheumatologic manifestations	Not indicated	Nonsteroidal anti-inflammatory agents
Chronic Pulmonary	Treatment indicated	Amphotericin B followed by Itraconazole for a total of 12-24 months
Disseminated in non-AIDS	Treatment indicated	Amphotericin B followed by Itraconazole[2] for a total of 12 weeks
Disseminated in AIDS	Treatment for life	Amphotericin B followed by Itraconazole[2,3] for life
Fibrosis Mediastinitis	Controversial. To be considered in cases with elevated ESR or complement fixation titers $\geq$1:32	Itraconazole for 3 months

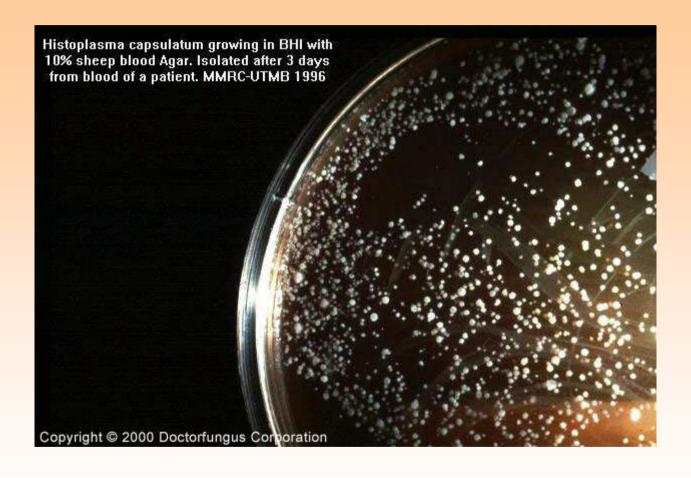
Istopatologia

Quadro istopatologico diverso:

- nell'istoplasmosi acuta il microrganismo lo troviamo negli istiociti e nelle cell. Reticoloendoteliali.le cell. Si presentano allargate ma non evidenza di infiammazione. I lieviti gemmanti intracellulari sono c.ca 3 μm in diametro, simile alla *Leishmania*, ma non contiene cinetoplasto e non si colora con le colorazioni usate per miceti.
- Nelle lesioni croniche si trovano dei granulomi che hanno un'area centrale caseosa simile alla tubercolosi.
- I noduli polmonari solitari sono ben organizzati e usualmente hanno una capsula calcificata che ne determina la loro visibilità all'RX. I funghi al suo interno sono generalmente morti e si trovano al centro della lesione

H & E stained peripheral blood smear of a patient showing the yeast phase of Histoplama capsulatum within white blood cells. MMRC-UTMB 1996
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

Istoplasmosi- diagnosi di laboratorio

- **Aspetti macroscopici**: a 25°C colonie a crescita lenta (2-3 settimane), con tessitura da granulare a vellutata, a cotonosa. Il colore, inizialmente bianco, tende a diventare bruno. Il *verso* può risultare da giallo a giallo-bruno. La crescita del micete è stimolata da terreni ricchi, quali BHI, addizionato a sangue, anche se le caratteristiche si apprezzano meglio su SDA. Le colonie non sono sensibili a cicloeximide.
- A 37°C, crescita su BHI di colonie bianche, lisce, lievito-simili, cremose. La fase lievitiforme è inibita da cicloeximide.

Histoplasma capsulatum growing in BHI with 10% sheep blood Agar. Isolated after 3 days from blood of a patient. MMRC-UTMB 1996

Istoplasmosi- diagnosi di laboratorio

- **Aspetti microscopici**: a 25°C le ife sono settate e ialine. I conidiofori, corti e indifferenziati, originano ad angolo retto da ife vegetative. I macroconidi sono larghi (8-20 mm), rotondi, unicellulari, ialini, a parete spessa e tubercolata. I microconidi unicellulari (2-6 mm), ialini, rotondi o piriformi, a parete liscia o rugosa, originano da corte ramificazioni ifali o direttamente dalla superficie di quest'ultime.
- Sonde Molecolari specifiche.

Histoplasma capsulatum , macroconidia and microconidia, UTMB MMRC 5/1997

AFRICAN HISTOPLASMOSIS

Etio: *Histoplasma capsulatum var. duboisii*

Differenziazione da forma classica

- Lieviti più spessi
- Presenza di cell giganti nei tessuti infetti
- Ridotto coinvolgimento polmonare
- Maggiore frequenza di lesioni cutanee ed ossee

Coccidioides immitis

Coccidioidomicosi

- **Epidemiologia – Patogenicità**: micete responsabile di coccidioidomicosi, malattia infettiva altamente contagiosa. L'infezione può manifestarsi in forma asintomatica, in forma acuta benigna polmonare, o come grave malattia cronica, spesso mortale, prevalentemente a localizzazione polmonare. In soggetti predisposti, l'infezione può evolvere in forma sistemica, con interessamento di cute, tessuti sottocutanei, articolazioni, linfonodi, meningi e SNC.

Coccidioidomicosi

- Il fungo è endemico nelle zone semi-desertiche al confine tra gli Stati Uniti ed il Messico (dal Texas occidentale alla California), in America Centrale e Meridionale. Non è presente in Europa. L'*habitat* del fungo è rappresentato dal terreno, specialmente quello alcalino, in particolare di zone aride o desertiche (Lower Sonoran Life Zone): questo ambiente è caratterizzato da rare piogge, che consentono lo sviluppo della forma miceliale, seguite da lunghi periodi di siccità. Durante i periodi umidi si formano migliaia di artroconidi (spore) separati tra loro da una cellula vuota, che va incontro a morte durante i periodi secchi, consentendo agli artroconidi di disperdersi nell'aria.

Coccidioidomicosi
Patogenesi

- L'infezione nell'uomo è generalmente conseguente all'inalazione di artroconidi presenti nell'aria o nella polvere; sono segnalati casi d'infezione per via percutanea.
- *Coccidioides immitis* rappresenta uno dei miceti più pericolosi da maneggiare in laboratorio: sono infatti descritti alcuni casi di infezioni contratte da personale di laboratorio in seguito alla manipolazione errata delle colture.

Coccidioidomicosi

Le epidemie avvengono dopo uragani o tempeste che disperdono gli artroconidi. La coccidioidomicosi è acquisita per inalazione delle spore (artroconidi). Raggiunti i polmoni gli artroconidi si trasformano in forme sferiche dette "sferule". Dopo 7-21 gg si manifesta un'affezione polmonare acuta che si risolve generalmente in pochi giorni. L'infezione comunque può cronicizzare o disseminare alle meningi, ossa, articolazioni e tessuto cutaneo e sottocutaneo. Circa il 25% dei pazienti con malattia disseminata presenta meningite

Sferule

COCCIDIOIDOMYCOSIS
Presentazione Clinica

Inf. PRIMARIA

- ✓ Asintomatica
- ✓ Febbre, dolore toracico, tosse, perdita di peso
- ✓ Lesioni nodulari nel polmone

SECONDARIA (DISSEMINATA) INF. (1%)

- ✓ Cronica / fulminante
- ✓ Infezione del polmone, meningi, ossa e cute

COCCIDIOIDOMYCOSIS Patogenesi

- Inalazione di particelle infettive, artroconidi e formazione di sferule in vivo
- Infarcimento dei fagosomi dei macrofagi alveolari
- Attivazione dei macrofagi- -killing
- Formazione di immunocomplessi
  - ⇨Deposizione con infiammazione
  - ⇨immunosopressione che deriva dal legame dei complessi al recettore Fc cellulare

Presentazioni cliniche

CATEGORIES	NOTES
Asymptomatic	1.Occurs in about 50% of patients
Acute Symptomatic	1.Pulmonary syndrome that combines cough, chest pain, shortness of breath, fever, and fatigue. 2.Diffuse pneumonia affects immunosuppressed individuals 3.Skin manifestations include fine papular rash, erythema nodosum, and erythema multiforme 4.Occasional migratory arthralgias and fever
Chronic Pulmonary	1.Affects between 5 to 10% of infected individuals 2.Usually presents as pulmonary nodules or peripheral thin-walled cavities
Extrapulmonary/Disseminated Varieties	
Chronic skin disease	1.Keratotic and verrucose ulcers or subcutaneous fluctuant abscesses
Joints / Bones	1.Severe synovitis and effusion that may affect knees, wrists, feet, ankles, and/or pelvis 2.Lytic lesions commonly affecting the axial skeleton
Meningeal Disease	1.The most feared complication 2.Presenting with classic meningeal symptoms and signs 3.Hydrocephalus is a frequent complication
Others	1.May affect virtually any organ, including thyroid, GI tract, adrenal glands, genitourinary tract, pericardium, peritoneum

Coccidioidomicosi- diagnosi

Campioni: Escreato, tessuto

1. **esame Diretto** (KOH; H&E)

   Sferule

2. **Coltura**

   SDA: Colonie filamentose a 25 °C

   Sferule in vitro con incubazione in terreni ricchi 40°C, 20% CO_2

Coccidioidomicosi- diagnosi

3. **Sierologia**

Precipitine (IgM)

Fissazione del Complemento

test cutaneo (coccidioidina e antigene sferulina) Un risultato negativo esclude la diagnosi

Coccidioidomicosi- diagnosi

- **Aspetti macroscopici**: a 25°C il micete manifesta una crescita moderatamente lenta (10-12 giorni). Su Sabouraud Dextrose Agar le colonie, inizialmente umide, glabre, grigiastre, tendono rapidamente a diventare cotonose o vellutate, di colore bianco, con tendenza al grigio-bruno con l'invecchiamento. Il *verso* della colonia è grigiastro. Il grado di crescita e l'aspetto presentano notevole variabilità. Lo sviluppo è inibito da cicloeximide. Mentre a 35-37°C viene mantenuto l'aspetto filamentoso, a 37-40°C, su particolari substrati e a livello tissutale, può produrre sferule rotondeggianti.

Coccidioidomicosi- diagnosi

- **Aspetti microscopici**: a 25°C si osserva la presenza di ife ramificate, settate, che producono artroconidi rettangolari, a botte, a parete spessa (2-4 x 3-6 mm) che comportano la diagnosi differenziale con *Geotrichum* spp. Caratteristica di queste specie è l'alternanza di artroconidi a parete spessa, più scuri, con cellule a parete sottile, più chiare (*disjunctor cells*). Gli artroconidi vengono liberati per frammentazione del micelio. A 37-40°C o a livello tissutale, presenza di sferule (15-80 mm), larghe, rotondeggianti, a parete spessa, che contengono endospore (2-5 mm).

- La determinazione di **esoantigeni** mediante *test* di immunodiffusione è il metodo di scelta per la conferma diagnostica.

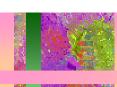
COCCIDIOIDOMYCOSIS Trattamento

Trattamento Sintomatico (primary infection)

- Amphotericin B
- Itraconazole
- Fluconazole(particolarmente per meningiti)

BLASTOMYCOSIS

- **<u>Etio</u>**: *Blastomyces dermatitidis*
- **<u>Location</u>**: America, Africa, Asia
- **<u>Micr</u>.**: Lieviti a 37°C—la gemma rimane attaccata alla cell parentale attraverso una larga base

  Ife e conidi a 25 °C

- **Descrizione e Natural Habitats**

  Blastomyces dermatitidis è un fungo dimorfico e un probabile saprofita del suolo. Si trova prevalentemente in materiale organico, legno in decomposizione. *Blastomyces dermatitidis* è isolato raramente dall'ambiente, e in campioni che contengono materiale organico come feci animali, frammenti vegetali, residui di insetti e polvere. Se il substrato è umido, riparato dai raggi solari diretti e contiene residui organici, mantenendo pH inferiore a 6.0 è probabile isolare *Blastomyces dermatitidis*.

- E' endemico in Nord America. Mississippi, Ohio and Missouri. Il tipo Africano sembra differisca da quello del Nord America. Questi due gruppi costituiscono due distinti sierotipi di *Blastomyces dermatitidis* che mostrano diversità geografiche. Hanno antigeni comuni.

BLASTOMYCOSIS Patogenesi

- Inalazione di particelle infettive
- Inoculo primario cutaneo
- Infiltrazione di macrofagi e neutrofili e formazione di granulomi
- Killing Ossidativo dei neutrofili e attività fungicida dei macrofagi

BLASTOMYCOSIS
Clinical findings

- ASYMPTOMATIC INF.
- PULMONARY INF.
- CHRONIC CUTANEOUS INF.
  - Subcutaneous nodule, ulceration
- DISSEMINATED INF.
  - Skin, bone, GUT, CNS, spleen
- PRIMARY CUTANEOUS INF.

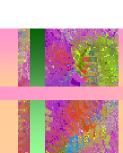
BLASTOMYCOSIS
Diagnosis-I

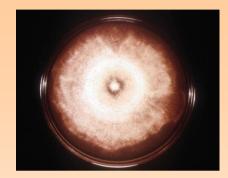
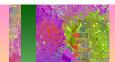
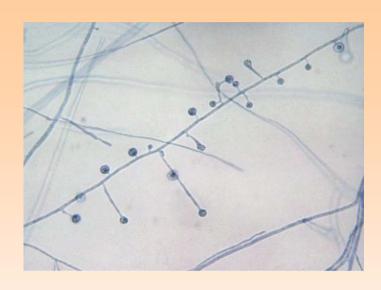
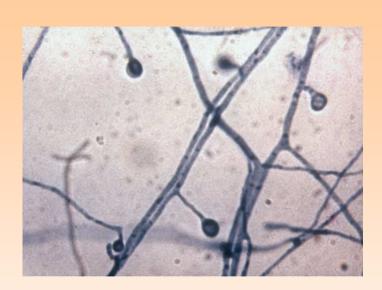
Samples: Sputum, tissue

1. **Direct micr.ic exam**: KOH, H&E

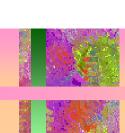
   Yeast cells; bud is attached to the parent cell by a broad base

2. **Culture**: Mould at 25°C

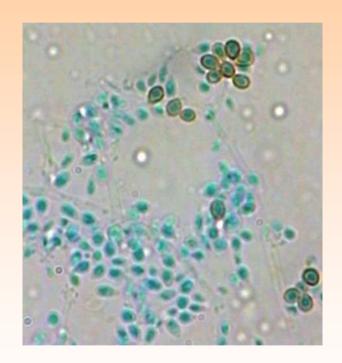
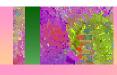
   Conversion to yeast on an enriched medium at 37°C

Microscopia diretta

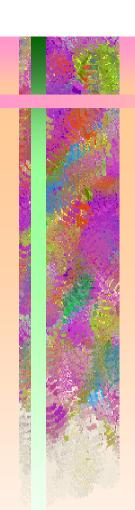
Colturale

Microscopia

BLASTOMYCOSIS
Diagnosis-II

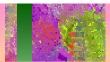
3. <u>Serology:</u> Immunodiffusion test
ELISA to detect antibodies to exoantigen A

<u>Skin test</u> (Blastomycin antigen)
Limited/no diagnostic value

BLASTOMYCOSIS Treatment

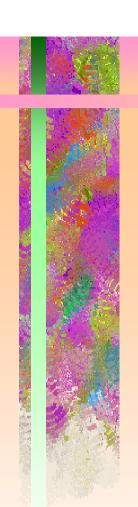
- Amphotericin B
- Itraconazole
- Fluconazole
- Corrective surgery

Sporotricosi

Epidemiologia :

- *Sporothrix schenckii* è responsabile di un'infezione nota come sporotricosi. Clinicamente la sporotricosi si può manifestare in forma cutanea-linfatica, conseguente ad un impianto traumatico, vera e propria malattia professionale (in passato detta: "malattia dei rosai"), interessando giardinieri e agricoltori, in forma polmonare primitiva, acquisita probabilmente per inalazione di conidi e in forma disseminata con lesioni cutanee e sottocutanee, infezioni ossee e articolari, coinvolgimento polmonare. Sono stati descritti rari casi d'infezioni localizzate al sistema nervoso centrale, all'occhio e all'apparato genito-urinario. *S. schenckii,* nelle due varianti *S. schenckii* var.*schenckii* e *S. schenckii* var.*luriei,* è variamente distribuito nell'ambiente, sviluppandosi su piante in decomposizione, sulla corteccia di alberi e su cespugli; è stato isolato in animali domestici e selvatici. Esso è endemico in tutte le parti del mondo, pur essendo prevalente in regioni tropicali e subtropicali. Il fungo può essere responsabile di episodi epidemici, come quello descritto in USA nel 1992 e associato a muschio contaminato.

Patogenicità

- Tra i fattori di virulenza del fungo sono contemplati enzimi extracellulari, quali una fosfatasi acida, in grado di condizionare l'interazione tra micete e macrofagi o con altre cellule. La capacità di invadere cute e tessuti sarebbe invece da attribuire a proteinasi extracellulari, quali proteinasi I (serina-proteinasi) proteinasi II (aspartico-proteinasi), in grado la prima di provocare lisi a livello dello strato esterno della cute, la seconda di agire su collageno ed elastina.

Forms of the disease

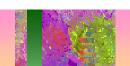
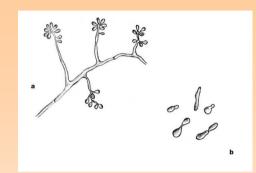
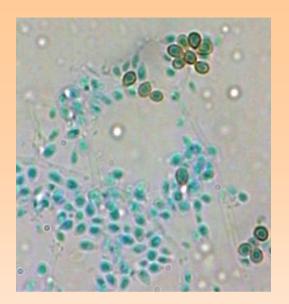
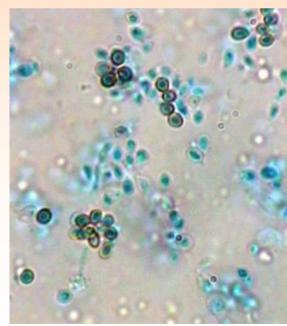
CATEGORIES	NOTES
Cutaneous	Varieties: 1.Lymphocutaneous sporotrichosis: affects the skin, subcutaneous tissues and regional lymphatics 2.Fixed sporotrichosis: skin lesion evolves locally without spread
Osteoarticular	1.Arthritis and tenosynovitis that may affect joints of the hands, elbows, ankles or knees. The spine, hips and shoulders are usually not involved. 2.Sinus tracts and local spread to adjacent bones may develop.
Pulmonary	1.Classically produce enlarging cavitary lesions, unilateral or bilateral usually with pulmonary infiltrates. 2.May produce pleural effusion and hilar lymphadenopathy 3.Associated with alcoholism, diabetes, corticosteroid use, sarcoidosis and tuberculosis
Meningitis	1.Rare 2.Produce a typical chronic meningitis picture. 3.CSF cultures have a low sensitivity, serologic testing may be necessary
Disseminated	Varieties: 1.Multifocal tenosynovitis and arthritis that mimic gonococcal infection or seronegative spondyloarthropathy 2.Widespread visceral involvement associated with fungemia. Many organs may be involved, including the central nervous system (meninges or parenchyma), liver, spleen, bone marrow, and colon

Courtesy of C. Halde
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

Diagnosi colturale

- **Aspetti macroscopici**: a 25°C, le colonie, a crescita moderatamente rapida, sono umide, glabre, raggrinzite; di colore bianco, bianco-crema, tendono al bruno, bruno-nero. Ripetuti passaggi colturali comportano una riduzione della pigmentazione. Alcuni stipiti possono produrre un corto micelio aereo, assumendo una tessitura vellutata. A 37°C, su BHI, sviluppo di colonie cremose, lisce, lievito-simili.

Courtesy of C. Halde
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

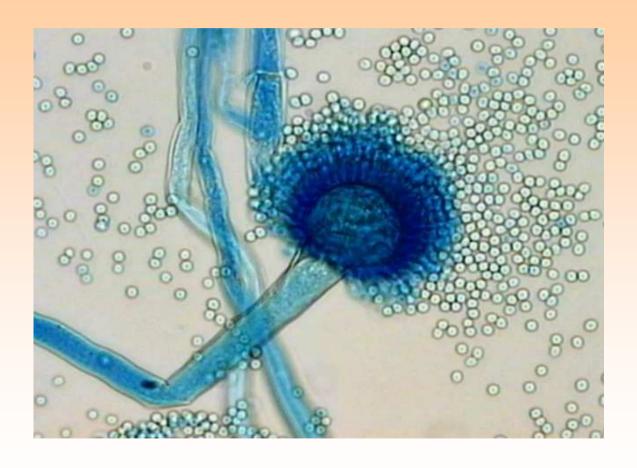
- **Aspetti microscopici**: a 25°C si osserva la presenza di ife sottili, settate e ramificate. I conidiofori ifa-simili, ialini, settati, simpodiali, spesso con apice dilatato, originano ad angolo retto dalla componente ifale sottostante. Sono presenti conidi globosi o clavati (2-3 x 3-6 mm), che originano su sottili denticoli, all'apice del conidioforo, assumendo talvolta l'aspetto a rosetta. Nelle colture più vecchie i conidi possono trovarsi lungo i conidiofori o direttamente sulle ife. Possono essere presenti anche conidi a parete più spessa, dematiacei, che originano lungo le ife. A 37°C presenza di cellule singole, gemmanti, fusiformi, di varie dimensioni (2-3 x 3-8 mm).

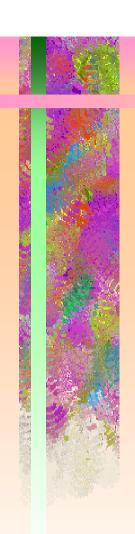
a
b

Istopatologia

The pattern of inflammation is characteristically well circumscribed and granulomatous with central areas of acute suppuration. In the skin, this pattern is similar to that seen in blastomycosis and coccidioidomycosis. Demonstration of the organism in tissue may be difficult because the fungi are not numerous. It may be necessary to search through many serial sections before observing the organism. The fungus is yeast-like, subglobose to ovoid, and 3-5 μm in diameter. The organisms are often described as cigar-shaped. The yeasts are not encapsulated. An asteroid body may be present and consists of globose to ovoid, basophilic cells, 3-5 μm in diameter with radiating eosinophilic rays up to 10 μm in diameter. An asteroid body formation appears to be more common in secondary lesions than in primary ones.

Terapia

- Sporotrichosis is in general an indolent infection that requires prolonged therapy but usually responds . Due to the temperature sensitivity of the fungus, local application of hyperthermia can be used for the treatment of cutaneous lesions. However, systemic therapy, especially with oral azoles such as itraconazole, has shown to be very effective. Therapy with iodide (given as a saturated solution of potassium iodide, or SSKI) is also effective. Treatment is continued for 3 to 6 months in cases of skin lesions and at least 12 months for osteoarticular forms. Prognosis of disseminated disease is grave. Amphotericin B is reserved to treat relapsed lymphocutaneous disease, pulmonary, disseminated sporotrichosis as well as for serious infections presenting during pregnancy. Antibacterial antibiotics are useful when secondary bacterial infections occur.

Aspergillus fumigatus

Aspergillosi

- I miceti del genere *Aspergillus* sono saprofiti diffusi in ogni ambiente (specie ubiquitarie saprofitiche) e contaminanti di svariati substrati.
- *Microhabitat* particolarmente favorevoli sono rappresentati dal terreno e da materiali vegetali in decomposizione: sono, quindi, ritrovabili ovunque, in natura, ed anche negli spazi confinati in cui siano conservati prodotti di origine vegetale (ad esempio: depositi di derrate alimentari, stalle, pollai, magazzini di legname) e nell’aria.

Aspergillosi

- La capacità di *Aspergillus* spp. di crescere su svariati substrati in condizioni ambientali molto variabili rende questi miceti capaci di colonizzare anche tessuti animali sia vitali che non vitali.
- La termofilia di *A.fumigatus*, che ne consente lo sviluppo a temperature sino ad oltre 50°C, spiega la frequenza con cui questo micete è rinvenuto anche in materiali organici in fermentazione (letame, vegetali conservati in silos, ecc.)
- La presenza di aspergilli è stata ripetutamente osservata anche in ambiente ospedaliero.

Aspergillosi
Fattori di virulenza

- Capacità di sintesi dei principali metaboliti (sintesi dei folati, sintesi della lisina, sintesi di uridina)
- Controllo della crescita (ammonio come fonte di azoto)
- Termotolleranza (abilità dei conidi di germinare – picco di sintesi proteica- anche a 42°C)
- Sintesi della chitina: formazione di ife rigide in grado di interagire con l'ambiente
- Sintesi di melanina: protezione dai raggi UV, dalla lisi enzimatica, dalla ossidazione, dalle temperature estreme;
- Produzione di antiossidanti: catalasi, Cu,Zn superossido- dismutasi,
- Produzione di proteasi (ruolo soprattutto in aspergilloma e aspergillosi polmonare allergica)
- Tossine: mitogillina e restrictocina (citotossiche, inibiscono la sintesi proteica, attività ribonucleolitica), gliotossina (inibisce fagocitosi macrofagica e induce citotossicità nelle cell-T)

Aspergillosi

- Alcune specie assumono importanza in Micologia Clinica in quanto patogene per gli animali e per l'uomo, e per la loro capacità di produrre metaboliti tossici; altre specie, viceversa, svolgono un ruolo importante in campo industriale per la produzione di acidi organici o di enzimi, o come *promoter* in processi fermentativi di alcuni alimenti, soprattutto nella cucina orientale.

Aspergillosi

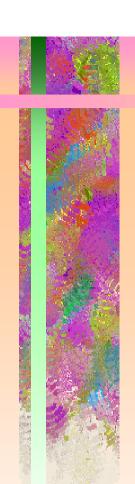
- I membri del genere *Aspergillus* sono responsabili di un gruppo di malattie note come aspergillosi, che possono colpire gli animali e l'uomo: l'invasione tissutale deve però sempre essere considerata come accidentale al ciclo vitale di *Aspergillus*, normalmente saprofitico in natura.

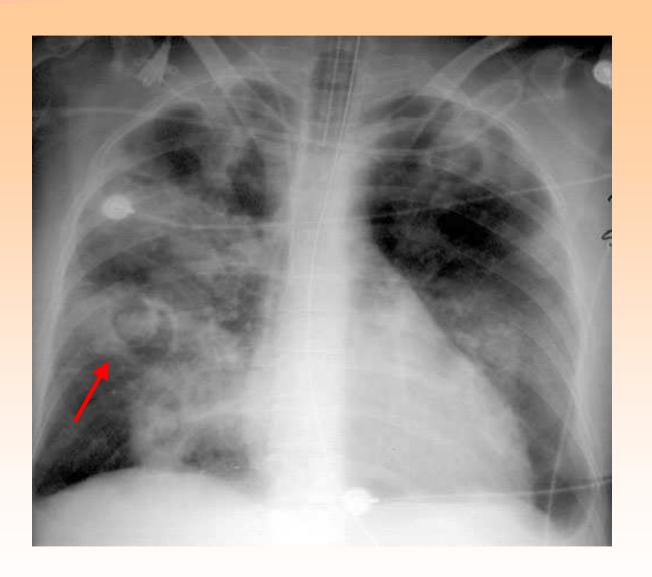
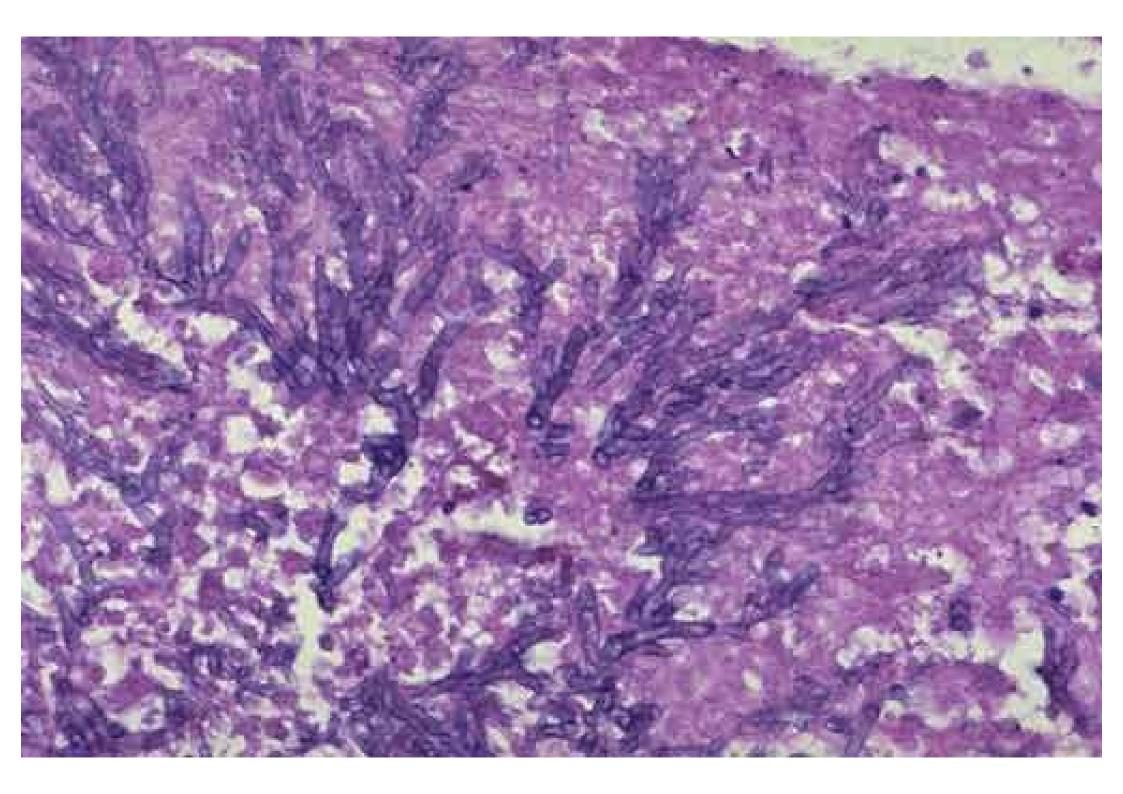
Aspergillosi

- Le specie responsabili di manifestazioni cliniche sono una ventina. In ordine di frequenza sono:
- *A. fumigatus* (responsabile di circa il 90% dei quadri ad eziologia aspergillare);
- *A. flavus, A. niger, A. nidulans ed A. versicolor*, nel complesso causano l'8-9% delle aspergillosi;
- *A. ochraceus, A. terreus* ed *A. clavatus* che, con un'altra decina di specie, costituiscono il rimanente 1%.
- Il genere contiene più di 180 specie con riconoscimento di almeno settanta forme teleomorfe.

Aspergillosi

- Le forme cliniche includono:
- le **colonizzazioni**, da porre in relazione con l'inalazione di conidi, ovvero – più raramente - all'ingestione di cibi contaminati;
- le **infezioni invasive**, a componente infiammatoria (con localizzazione polmonare, più raramente auricolare, o con disseminazione viscerale);
- le **manifestazioni allergiche**.

Le malattie da infezione aspergillare presentano un carattere tipicamente **opportunistico**, con localizzazioni in vari organi ed apparati di soggetti variamente immunocompromessi, perché sottoposti a prolungati trattamenti immunosoppressivi o chemioantibiotici, o perché affetti da malattie di base altamente debilitanti. Il tipo di affezione dipende quindi dalle condizioni dell'ospite e dalla specie fungina coinvolta.

Aspergillosi invasiva: quadri clinici

- Tracheobronchite necrotizzante da aspergillo
- Aspergillosi bronchiale ostruttiva
- Aspergillosi polmonare invasiva acuta
- Aspergillosi polmonare necrotizzante cronica
- Aspergillosi dei seni paranasali e delle mastoidi
- Aspergillosi primitiva cutanea e dei tessuti molli
- Aspergillosi primitiva dell'apparato digerente
- Aspergillosi disseminata

Invasive aspergillosis in organ transplant recipients (CID 2000)

Type of transplant	*Incidence mean (range)*	*time to onset- mean*	*Mortality rate (%)*
Liver	2 (1-8)	17 days	87
Lung	6 (3-14)	120 days	68
Heart	5.2 (1-15)	45 days	78
Kidney	0.7 (0.9-4)	82 days	77
Pancreas	1.3 (1.1-2.9)	NA	100
Small bowel	2.2 (0-3.6)	NA	100

Aspergillosi invasiva: frequenza nell'ospite immonocompromesso (Denning D, 1996)

Condizione clinica	Range %
Leucemia acuta	5-24
Trapianto di midollo allogenico	4-9
Trapianto di midollo autologo	0,5-6
AIDS	0-12
Trapianto di fegato	1,5-10
Trapianto di rene o cuore	0,5-10
Trapianto di polmone o di cuore-polm.	19-26
Malattia granulomatosa cronica	25-40

Scarsi progressi in diagnostica delle aspergillosi invasive

- 1970

  Diagnosi clinica di AI non fatta nel 68% di casi “evidenti” all’autopsia.

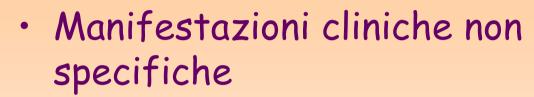
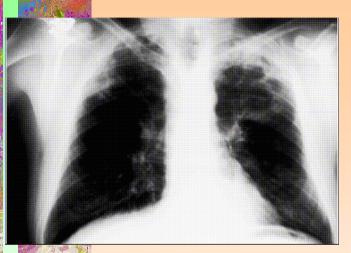
  Young, Medicine 1970: 49:147-173
- 1996

  68% dei pazienti con AI provata all’autopsia non avevano ricevuto terapia

  Groll, J.Infect 1996; 33:23-32
- 2006

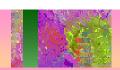
  Diagnosi prevalentemente basata su CT

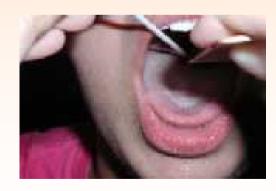
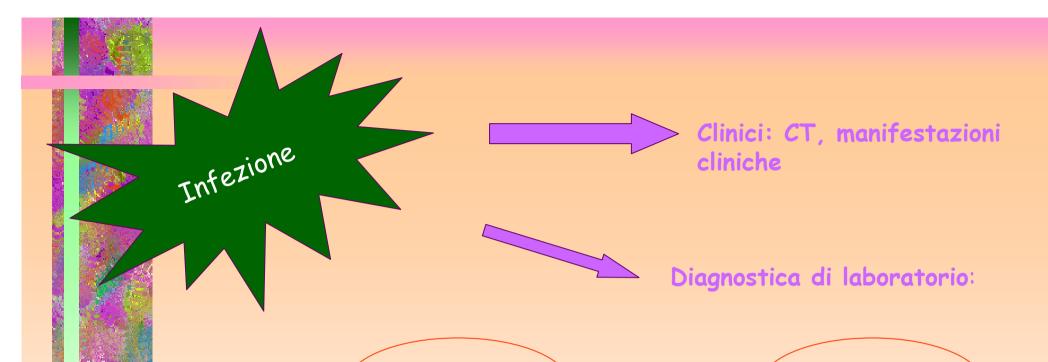
  Horger, M. Br J Rad. 2005; 78:697-703

Perché questa scarsità di progressi?

- Manifestazioni cliniche non specifiche
- Diagnostica convenzionale troppo poco sensibile e troppo TARDI!
- Scarsa utilizzazione di procedure diagnostiche invasive

Aspergillus/Candida:
ATTENZIONE alle colonizzazioni

I miceti possono essere sia colonizzanti che patogeni, quindi altissima vigilanza va posta nell'interpretazione di:

- colture superficiali
- antigeni,screening in PCR, presenza di anticorpi o metaboliti

Sito sterile

Ottenere un campione clinico

Flora commensale

DIRETTA

Coltura

PCR

Microscopia

INDIRETTA

Antigeni

Comp. Parete cellulare

Anticorpi

Campioni:

Diretta: Biopsia, sangue, liquor, tamponi,….

Indiretta: Sangue, BAL, liquor,…

Diagnostica per Funghi

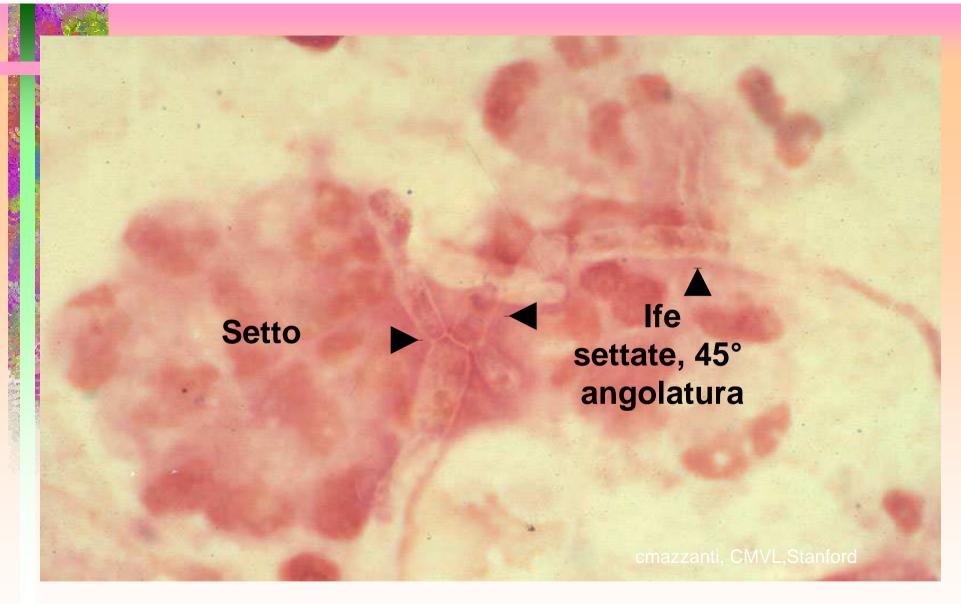
Anatomia patologica

Colorazioni specifiche
Immunodiagnostica

Laboratorio Micologia

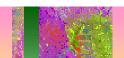
Metodi convenzionali:
- Coltura
- Esame microscopico

Metodi non convenzionali

Culture/Microscopy Based Diagnosis

MICROSCOPIA

Chi è?

Microscopia in Laboratorio: cosa è disponibile

- Fluorescenza con KOH
  - Blankophor
  - Calcofluor
  - Uvitex 2B
- Obiettivo micrometrico
- Occhio esperto!!

Specimens eg. BAL oder Tissue			
Yeasts		**Moulds**	
capsular	*C. neoformans*	**Septated hyphae**	***Aspergillus* species** ***Fusarium* species** ***Geotrichum* species**
Small oval yeasts	*Histoplasma capsulatum*		
large (8-15 µm) thick-walled yeasts, budding	*Blastomyces dermatitidis*		
Budding with different sizes (2-30µm), multiple	*Paracoccidioides brasiliensis*	**Unseseptated hyphae**	***Absidia* species** ***Rhizopus* species** ***Mucor* species**
Yeasts, pseudohyphae	*Candida* species		

Microscopic examination/Culture: „Gold standard" diagnosis

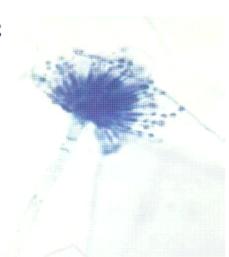
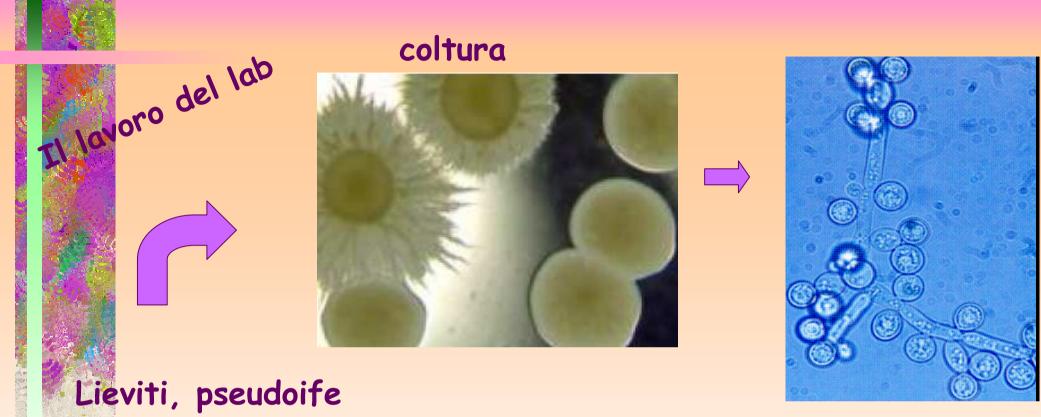
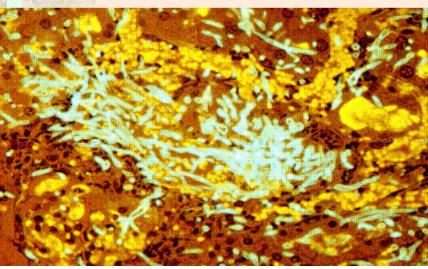
- Fast, simple
- Microscopic examination (Calcofluor White Immunfluorescence)
- Sensitivity (48%-63%) 98%
- No genus and species identification
- Hyphal positivity in sterile specimens= proven infection
- Guiding treatment

- Positive culture from tissue (~50%)

Denning, 1998

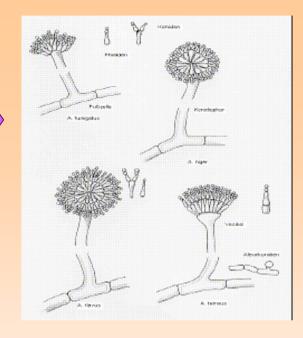
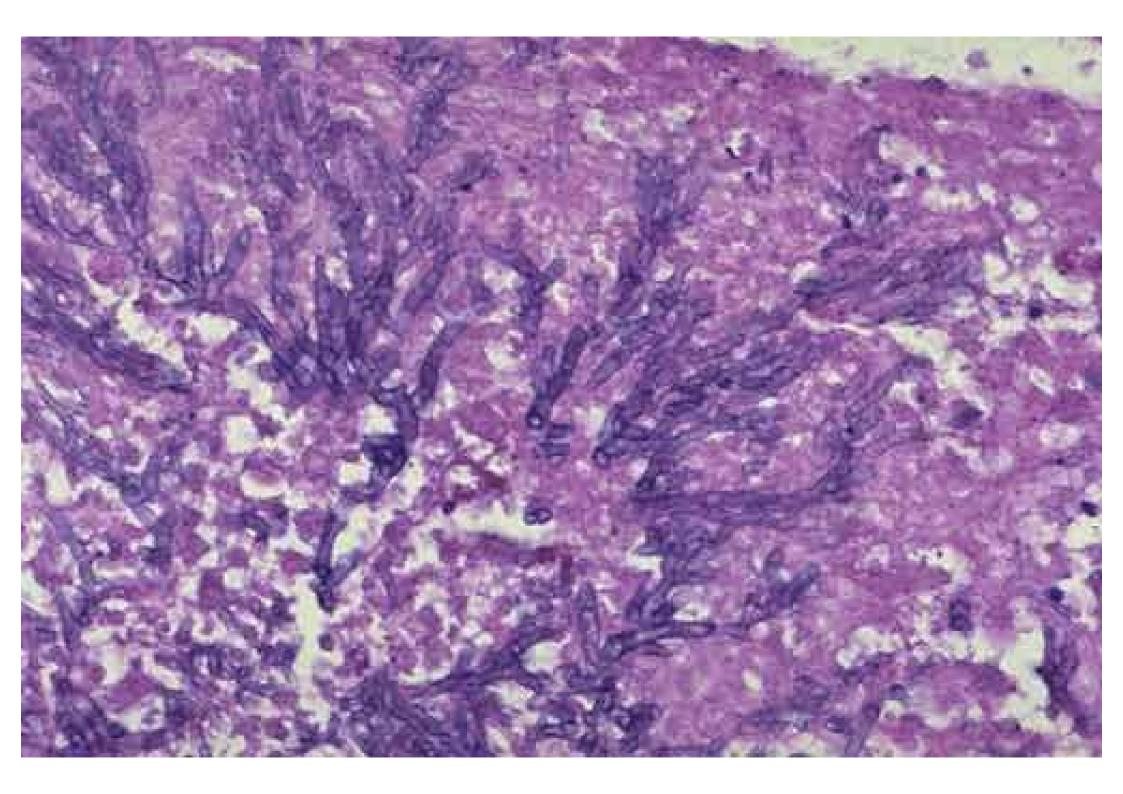
Il lavoro del lab

coltura

Lieviti, pseudoife

Identificazione di specie

Il lavoro del lab

coltura

ife

Identificazione di specie

COLTURE

Aspergillosi
Diagnosi colturale

- Le specie del genere *Aspergillus* vengono classificate in base alle caratteristiche macroscopiche delle colonie ed a quelle della struttura microscopica.

Aspergillosi
Diagnosi colturale

- Il <u>colore</u> della parte aerea della colonia, condizionato dal micelio vegetativo, dalle teste conidiali e dall'eventuale presenza di cleistoteci, è un carattere molto importante e viene universalmente accettato per la caratterizzazione delle specie. Il <u>grado di crescita delle colonie</u>, in termini di tempi e di dimensioni (diametro), così come l'aspetto dei margini delle colonie può variare in funzione della specie (margini netti, irregolari, sottili o spessi, sommersi). La <u>tessitura di superficie</u> (vellutata, polverosa, fioccosa, ...) e l'eventuale capacità di presentare aloni concentrici (zonazione), costituiscono altri caratteri tipici in definite condizioni di crescita. Le colonie di *Aspergillus* spp. sono solitamente a rapida crescita, si presentano a tessitura polverosa, granulare, fioccosa, con pigmentazione variabile dal bianco, al giallo, al giallo-bruno, a varie tonalità di verde, al rosso-bruno, al bruno-nero, per lo più costituite da un denso strato di conidiofori eretti.

Micosi invasive: update on conventional diagnosis

Colture

Terreni

- **Isolamento:** Sabouraud (+ antibiotics) blood agar, chocolate agar
- **Identificazione :** malt-extract, corn-meal agar, Czapek agar

Incubazione

temperatura	25-30°C
atmosfera	aerobia
durata	2-6 settimane

Identificazione rapida di *A. fumigatus*

±1 hr

24-48 hrs
a 35-37° C

3-7 giorni

Invasive aspergillosis : update on conventional diagnosis

In: Andreoni et al., Medical Mycology Atlas

DERMATOFITOSI (=Tigne = Ringworm)

- Infezioni della cute e annessi (peli, capelli, unghia) causate da un gruppo di funghi cheratinofili chiamati dermatofiti.

Microsporum	Peli. cute
Epidermophyton	Cute, unghia
Trichophyton	Peli, cute, unghia

DERMATOFITI

- Digeriscono la cheratina grazie alle cheratinasi
- Resistono alla cicloeximide
- Classificati in tre gruppi in relazione al loro habitat usuale

DERMATOFITI

- ANTROPOFILI

Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum...

- GEOFILI

Microsporum gypseum...

- ZOOFILI

Microsporum canis: gatti e cani

Microsporum nanum: maiali *Trichophyton verrucosum:* cavalli e maiali…

DERMATOFITOSI
Patogenesi e immunità

- Contatto e trauma
- Umidità
- Condizioni di affollamento
- Immunodeficienza cellulare →(inf. croniche)
- Re-infezioni possibili (necessario un inoculo abbondante e il decorso è più breve)

DERMATOFITOSI
Classificazione clinica

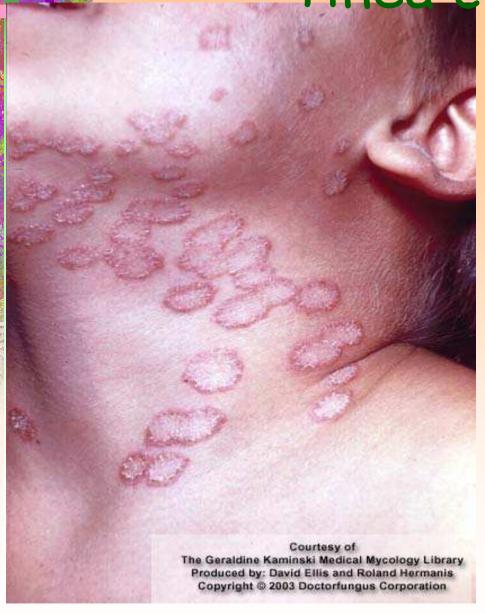
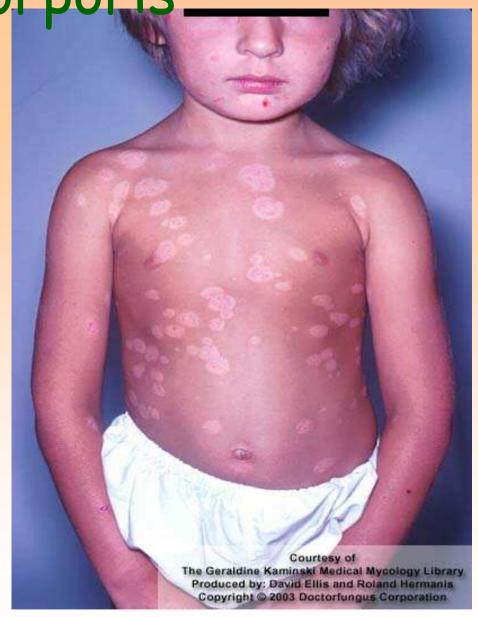
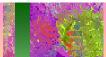
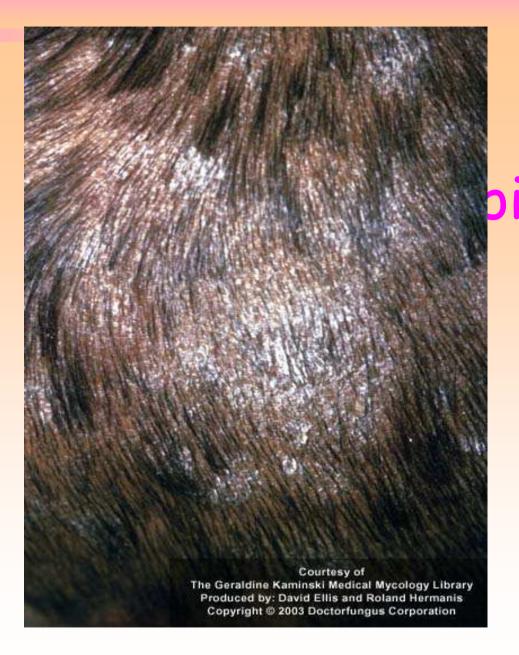
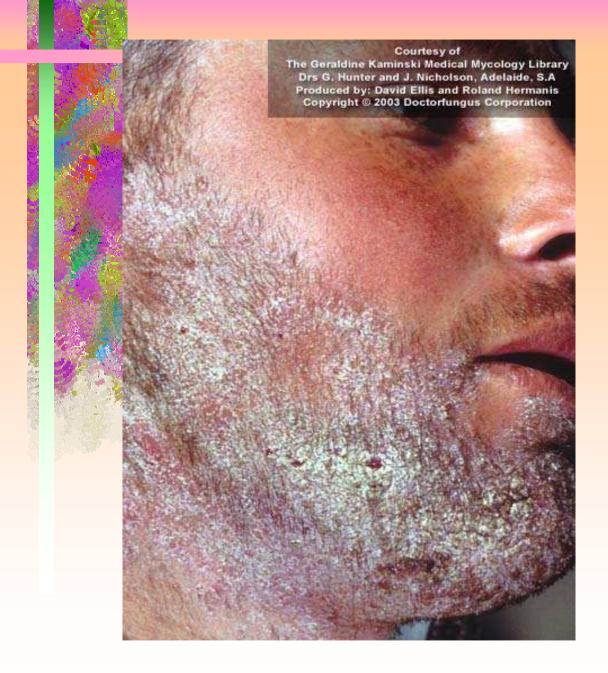
- Il quadro clinico è indicato dal sito anatomico coinvolto

a. Tinea barbae
b. Tinea corporis
c. Tinea capitis
d. Tinea cruris
e. Tinea pedis (piede d'Atleta)
f. Tinea manuum
g. Tinea unguium

Tinea corporis

Tinea corporis

itis

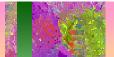
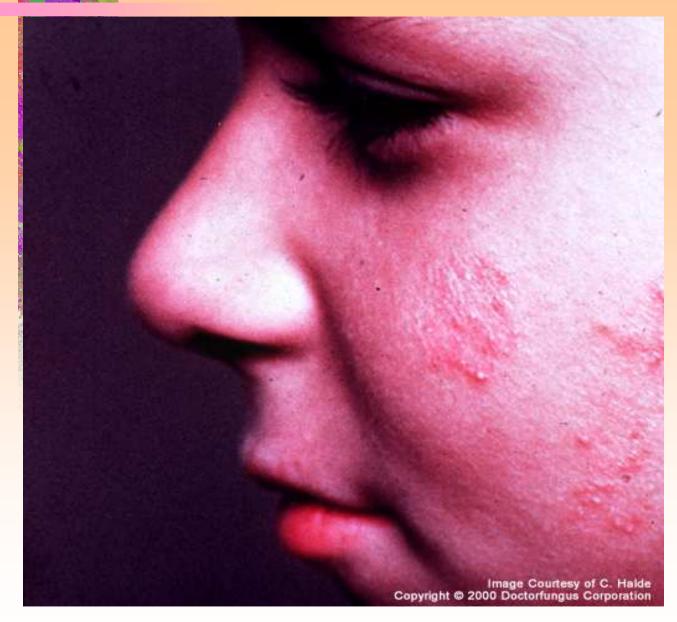
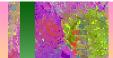
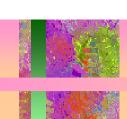
Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis

Tinea corporis

Tinea barbae

Tinea facies

Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Provided by: Mr. D. Connoll, Brisbane, Q1d
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis
Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation

Tinea manum

Tinea pedis

Image Courtesy of C. Halde
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

DERMATOFITOSI Trasmissione

- Contatti umani stretti
- Scambio di abiti, pettini, spazzole, asciugamani, lenzuola,... (Indiretta)
- Contatto animale-uomo (Zoofila)

DERMATOFITOSI
Diagnosi

I. Clinica

Aspetto tipico

Lampada di Wood (UV, 365 nm)

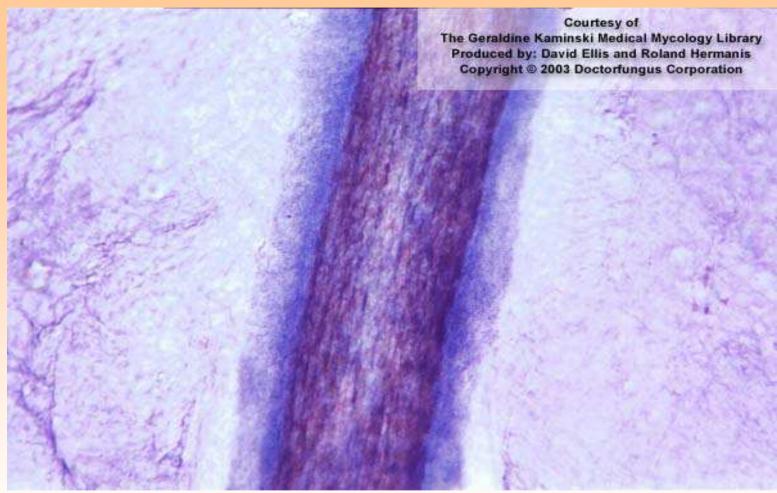
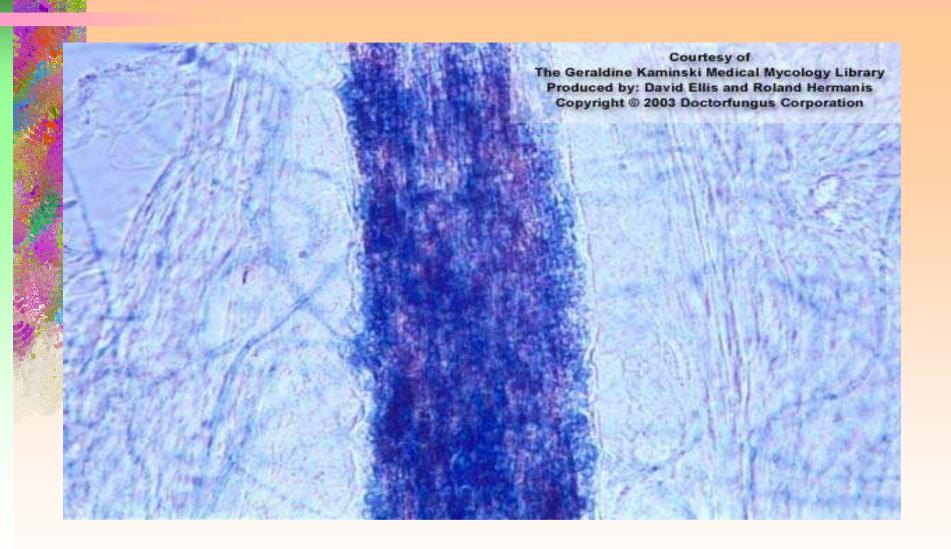
II. Laboratorio

A. Microscopia diretta

(10-25% KOH)

Ectothrix/endothrix/pelo favico

ectothrix

Courtesy of
The Geraldine Kaminski Medical Mycology Library
Produced by: David Ellis and Roland Hermanis
Copyright © 2003 Doctorfungus Corporation

endothrics

DERMATOFITOSI
Diagnosi

B. Colturale

Sabouraud dextrose agar

Dermatosel (+ cicloeximide)

DERMATOFITOSI
Identificazione

A. Caratteristiche delle colonie

B. Morfologia microscopica

	Macroconidi	Microconidi
Microsporum	fusiformi	(+)
Epidermophyton	clavati	(-)
Trichophyton	(pochi)cilindrici/ clavati/fusiformi	(+) singoli, a grappolo

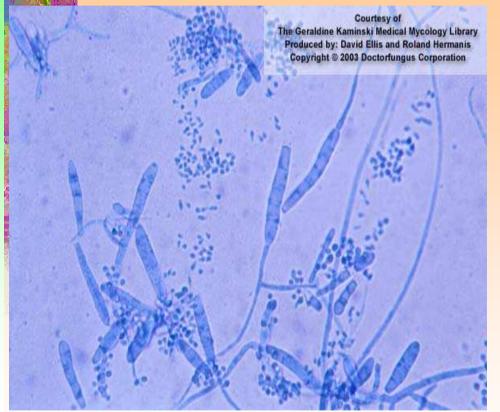
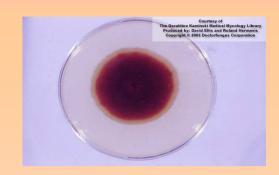
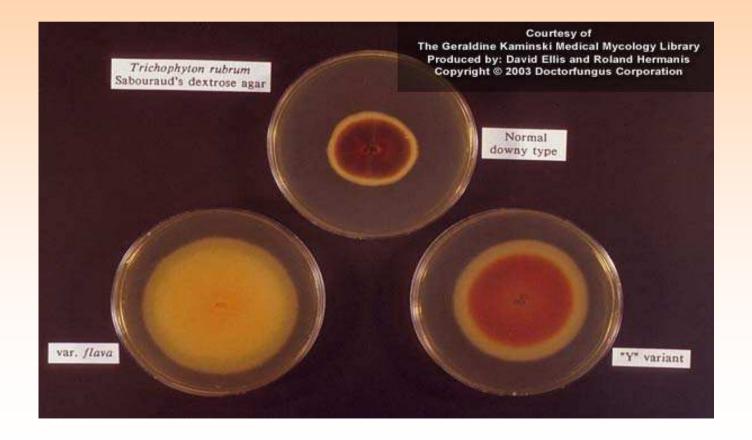
Microsporum

Trichophytum

Trichophyton rubrum
Sabouraud's dextrose agar

Normal
downy type

var. *flava*

"Y" variant

DERMATOFITOSI Identificazione

C. Test fisiologici

- Test di perforazione del capello in vitro
- Fabbisogno specifico di aminoacidi e vitamine
- Idrolisi dell'urea
- Crescita su grani di riso
- Tolleranza alla temperatura e accrescimento (tempi di crescita)

Test perforazione del capello: T. menthagrophytes